环介导等温扩增技术检测食品安全的研究进展

王静[1§]许鑫[1§]王雪雨[1]姚伦广[1]阚云超[1**]冀君[1**]

（南阳师范学院，南阳市兽医生物工程技术研究中心/南阳师范学院昆虫生物反应器河南省工程实验室，河南南阳 473061）

摘要：食品安全一直是全世界公众健康的关注焦点。环介导等温扩增（Loop-mediated isothermal amplification，LAMP）技术是一种特异性强、灵敏度高、快速简便的等温核酸扩增技术，近年来在核酸检测领域有着广泛的研究和应用。将 LAMP 技术应用到食品安全检测领域，可以快速准确的监控一些食品安全问题对人类健康所构成的危害。因此针对 LAMP 技术在食品安全检测方面的优势进行分析，并结合 LAMP 技术与新兴诊断技术平台的联合运用进行了展望。

关键词：环介导等温扩增　食品安全　核酸检测　优化　联合应用

近年来，由食品安全问题引发的事故屡见不鲜，对人类健康和社会安全都造成了很大的威胁。现在的食品安全问题主要分为两方面，一方面是食源性致病菌引发的食品安全问题，例如人畜共患的沙门氏菌和单增李斯特菌等。另一方面为食品质量的安全问题，例如食品掺伪问题，贩卖未标注转基因食品问题。

环介导等温扩增技术首次报道于 2000 年，由日本学者 Notomi 等创建[1]。它利用识别多区域特异性引物组和具有链置换活性的 *Bst*-DNA 聚合酶，在 65℃左右等温条件下 1 h 内能扩增出高达 10^9 拷贝的靶序列[2]。与常规 PCR 技术相比，LAMP 设备能简化操作流程、节省检测时间，又能满足快速检测的需要，更具有推广性。特别适用于基层单位及实地现场检测，有利于从源头控制食品安全事故的发生，非常适合食品检测机构、出入境检验部门、边远基层地区进行检测[3]。

1. LAMP 技术

1.1 LAMP 反应原理

环介导等温扩增反应可分为两个阶段。第一阶段为哑铃状初始结构的形成。首先由引物 FIP 与 F2c 区互补配对，通过 *Bst*-DNA 聚合酶延伸合成 DNA 链。然后 F3 引物

————————————————

*河南省高等学校重点科研项目(18A230012)

**通讯作者，电子邮箱：lunguangyao@163.com；jijun84@qq.com

§ 共同第一作者

与 F2c 区前端的 F3c 区互补配对，通过合成新的 DNA 单链置换掉 FIP 引物合成的 DNA 单链。被置换的单链存在互补的 F1c 和 F1 区，会自我碱基配对形成环状结构。同理，BIP 引物同该单链杂交合成互补链，在此过程中环状结构被打开。接着外引物（F3 与 B3）从 BIP 引物外侧插入杂交合成新的互补链。被置换的单链 DNA 两端存在互补序列，发生自我碱基配对形成环状结构，于是整条链呈现哑铃状结构。

第二阶段为循环扩增阶段。此阶段以哑铃结构的 3’末端的 F1 区段为起点，以自身为模板进行 DNA 合成延伸。同时，FIP 引物 F2 与环上单链 F2c 杂交，开始新的链置换反应，并且解离由 F1 区段合成的双链核酸。同样，在解离出的单链核酸上也会形成环状结构。在环状结构上存在单链形式 B2c，BIP 引物上的 B2 与其杂交，开始新一轮扩增，经过相同的过程又形成环状结构。由此，在同一条链上互补序列周而复始形成大小不一的扩增产物[4-5]。

1.2　LAMP 引物设计

LAMP 技术的关键点是设计扩增效率高且特异的工作引物，日本荣研公司开发了一个在线程序 PrimerExplorer V4（http://primerexplorer.jp/elamp4.0.0/index.html），以便于研究者筛选 LAMP 引物。一套用于 LAMP 反应的基础引物组，包括两个内引物 FIP 和 BIP，两个外引物 F3 和 B3，对应于靶基因的 6 个特异区域（5’末端的 F3c，F2c、F1c 区和 3’末端的 B1，B2，B3 区）[6]。此外，还可加入一对环状引物（正向环状引物 FLP 和反向环状引物 BLP）以促进链置换反应的进行，可以进一步缩短扩增反应的时间（图 1）。

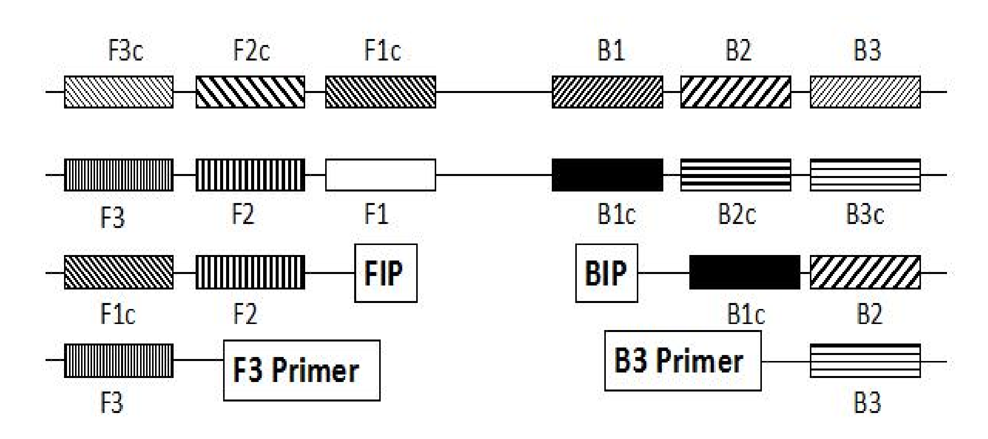


图 1　引物设计示意图

Fig. 1　Schematic diagram of LAMP primers design

1.3 LAMP 结果分析

目前分析 LAMP 的结果主要有肉眼观察、紫外荧光和凝胶电泳三种方法。三种方法因为检测手段和媒介的原因，各有以下特点：⑴肉眼观察法：即利用反应中核酸大量合成，析出的焦磷酸根离子与镁离子结合，产生焦磷酸镁白色沉淀，可用肉眼观察或浊度仪检测沉淀，依据沉淀判断反应与否。其中，直接观察沉淀最简单直观，成本也低，但是因为肉眼的敏感性存在个体差异，加上沉淀本身就比较微量，因此准确性和灵敏性有限制；⑵紫外荧光法：即在反应体系中加入荧光核酸染料（例如 SYBR Green I），与合成的核酸结合产生荧光，在紫外光照射下判定结果[7]。若反应混合物变为明亮的荧光绿色；反之则保持 SYBR Green I 橙色不变；该方法较沉淀观察法灵敏，但是步骤相对复杂；⑶凝胶电泳检测根据 LAMP 扩增后的产物为若干倍茎环或花椰菜状 DNA 的混合物，成像结果会出现阶梯状条带，来判断反应与否，反应产物还可以用限制性酶来鉴定产物的结构和大小。该方法是检测 LAMP 扩增的金标准，但是需要借助凝胶成像系统和电泳设备，且延长了检测结果判定的时间。

1.4 LAMP 特点

LAMP 作为一种新的核酸检测技术，有其突出的特点[8]。第一，与传统的检测方法相比，LAMP 工作引物分别针对靶基因的 6 个特异区域设计，决定了其超高的特异性。第二，与传统 PCR 检测相比，LAMP 灵敏性和效率更高，其检测下限可低至 10 个拷贝以下，灵敏度比常规 PCR 高 10 到 100 倍[9]。因此 LAMP 可用于感染早期进行疾病检测，大大规避假阴性的出现。由于不需要选择复杂的变温条件，且不需要模板的退火、复性过程，它比传统 PCR 检测所需的时间更短、也不需要昂贵的 PCR 仪等循环温控设备。第三，该技术最大的优势在于检测结果的可视化，也不需要昂贵、不易携带的凝胶电泳成像系统，符合基层和现场病原检测工作的需要。此外，由于 *Bst* 聚合酶相对于 PCR 使用的 *Taq* 酶更高的扩增抑制物耐性，在检测时甚至简单预处理后直接进行核酸扩增，无需核酸抽提，简化了检测流程并进一步降低了成本[10]。且改进的 *Bst* 2.0 WarmStart DNA 聚合酶可以在低于最适反应温度下抑制酶活性，因此可以在室温下进行体系配置，并可以消除非特异性反应产物，提高反应效率。而 *Bst* 3.0 DNA/RNA 聚合酶具有更佳的等温扩增活性并具备了逆转录活性，在以 RNA 为模板的 LAMP 实验中，可实现单酶系统反

应。该酶在60~70℃之间具有反转录活性，可实现具有二级复杂结构的RNA模板的反转录。

2. LAMP 食品检测方面的应用

经过研究和改进LAMP技术已较为成熟，并运用到了食品检测领域。根据食品安全问题的主要表现，LAMP技术主要运用于食源性致病菌检测和食品质量检测。

2.1 LAMP 检测食源性致病菌

食源性致病菌会引起食物的变质和影响成分破坏，同时绝大多数病原菌繁殖过程中产生有毒有害物质，会直接或间接威胁到人类健康，例如沙门氏菌、幽门螺杆菌等[11-12]。由食源性致病菌污染食品引起的食源性疾病是现在食品安全主要问题之一。传统食品致病菌检测技术耗时较长, 灵敏度、特异性都有待进一步提高。而LAMP技术可以快速有效检测食源性致病菌，具有较好的应用前景。

2.2.1LAMP 检测沙门氏菌

沙门氏菌可分离于猪肉、牛肉、鸡肉及其加工产品中, 是常见的食源性致病菌之一。目前检测沙门氏菌的LAMP方法已较为成熟。HAZEL等[13]成功研制出LAMP商品试剂盒来检测沙氏门菌，其可以快速检测鸭肉、豆芽、鱼丸中人工接种的低载量沙门氏菌，对自然污染样品的检测灵敏度和特异性分别达到91%和95%。用于检测104种血清型沙门氏菌和50种其它种属杆菌时，试剂盒具有99%的种内准确性和100%的种间特异性。但由于食品加工灭菌后死亡的细菌仍保留在食品中，而死细菌的DNA很难降解，因此造成针对沙门氏菌DNA的LAMP检测方法无法区分死活细菌，从而造成检测的假阳性。因此，利用RNA易降解的特性，可采用逆转录环介导等温扩增技术（RT-LAMP）进行样品中沙门氏菌的RNA反转录获得的DNA进行检测，可显著降低死细菌导致的假阳性。Techathuvanan 等[14]已成功利用RT-LAMP检测出猪肉和全蛋液中的沙门氏菌。

2.2.2LAMP 检测链球菌

LAMP也可以检测生鲜食品中的食源性致病菌。Sakura Arai 等[15]设计了一个新的LAMP检测猪链球菌的方法，命名为LAMPss。其以链球菌S. suis的重组/修复蛋白(*recN*)基因为靶点，设计LAMP引物组检测生猪肉中的链球菌。可以检测出S. suis的除20、22、26、32、33和34外的所有血清型的猪源链球菌，检测极限可达到5.4个CFU/ml。

实验结果表明，LAMP 能成为监测零售市场生肉的有效工具

2.2.3 LAMP 检测金黄色葡萄球菌

金黄色葡萄球菌是导致奶牛患乳房炎的重要病原菌，且受污染的牛奶及奶制品中的金黄色葡萄球菌肠毒素会引起食物中毒。李晓霞等[16]根据金黄色葡萄球菌的耐热核酸酶基因（*nuc*）在保守区域设计 LAMP 特异性引物，检测原料乳的金黄色葡萄球菌。在 63℃恒温反应 45 分钟，每 25 μL 反应体系的灵敏度为 110.0 fg，低于传统的 PCR 和 Real-timePCR 检测方法，但能够满足快速检测的要求。并且检测限为 67 CFU/ml，证明 LAMP 方法检测金黄色葡萄球菌具有良好的特异性。因此，LAMP 方法应用于食品中金黄色葡萄球菌的安全检测具有较好的应用前景，有待研究发展。

综上所述，使用 LAMP 技术检测食源性致病菌，可以缩短检测时间并提高灵敏性。为食源性致病菌的筛选带来极大便利，符合灵敏度高、操作简便的要求又能够同时保证检测的高通量，凸显了 LAMP 在食品安全检测领域十分重要的应用地位。

2.2　LAMP 食品质量安全检测

LAMP 技术也应用于食品质量的安全检测，诸如食品掺伪问题和贩卖未标注转基因食品问题等问题。

2.2.1LAMP 检测食品掺伪

食品掺伪即食品掺杂、掺假和伪造的总称。近年来很多关于食品掺伪的食品安全问题被报道，例如牛羊肉掺假肉、火锅调味加罂粟碱、假蜂蜜等问题。为保证食品质量安全，保障消费者的合法权益，亟待建立一种能快速准确鉴别、检测食品掺伪的方法。LAMP 作为一种快速灵敏的检测手段，已经被应用于检测食品掺伪。Deb 等[17]创立了一个 LAMP 快速检测体系，可用于检测山羊奶/肉样品掺假牛奶/肉，基于牛的宿主基因设计特异性 LAMP 引物组，对样品进行检测。这个测试可以检测到混合比低至 5%的混合牛山羊乳、肉样品。证明 LAMP 方法可有效检测出肉类掺假问题，可对其他肉类进行质检，应用于肉类市场的检查和管理。杨柳等[18]研发出 LAMP 试剂盒检测调味粉中的罂粟碱，利用罂粟碱的特异性基因序列设计 LAMP 试剂盒，对 8 种调味品进行 LAMP 检测，结果检测最低浓度可达 70 pg/μL，敏感性高于常规 PCR 方法的 10 倍。

2.2.2LAMP 检测转基因食品

伴随转基因技术的不断成熟，新的转基因食品不断进入市场，并且进出口贸易中转基因食品不断增多。因此的转基因食品的监管压力不断增加，需要有效监管转基因食品的检测技术。目前，LAMP 已逐步应用于转基因食品检测中。王聪等[19]利用可视化 LAMP 技术，用于筛查食品和饲料中的转基因食品成分，根据 8 个基因靶标分别对其设计引物(*CaMV35S* 启动子区、*FMV35S* 启动子区、*NOS* 终止子区、*Cry1Ac*、*PAT*、*BAR*、*NptII* 和 *CP4epsps*)用于转基因筛查，结果表明 8 个靶标检测限都可低至 10 个单倍体基因组当量（HGE），而常规 PCR 检测转基因筛选检测限需要高于 20 HGE，由此说明开发的 LAMP 检测方法更敏感，非常适合于样品中低含量核酸的检测。LAMP 方法检测转基因食品比 PCR 方法具有更高的灵敏度，反应用时更短，操作更简单，将来有望成为食品转基因检测的主要检测技术。

3. LAMP 的改进和优化

目前 LAMP 已成功用于食品安全的各方面检测中。随着技术的不断发展和革新，为了进一步提高其检测灵敏度和扩大应用范围，需要 LAMP 检测技术更加完善。因此，以 LAMP 为基础的衍生技术不断涌现和发展。

3.1 多重 LAMP

多重 LAMP 就是针对多个病原体设计出两套或两套以上的特异性引物，反应时可扩增出多个靶基因片段，然后根据检测区特异性酶切位点选用限制性内切酶“消化”产物，通过琼脂糖凝胶电泳分析判定存在某种病原与否[20-21]。此设计实现了在一个反应管中可一次性检测多种病原，节省了反应的材料和时间，提高了效率、降低了成本。最近，Stratakos 等[22]开发一种用于检测牛肉和牛粪中的非致病性大肠杆菌和毒素大肠杆菌（VTEC）的多重 LAMP，试验针对大肠杆菌 *phoA* 基因和 VTEC 菌株特有的 *stx*1、*stx*2 基因设计了三套引物。结果显示检测限为 10^3-10^2 CFU/g，且检测 58 种细菌菌株和标本时没有交叉反应，因此可用于监测牛肉的 VTEC 污染情况。该方法提示使用优化的引物组，可完成 LAMP 同时检测不同基因，进一步为其应用拓宽了领域。

3.2 RTF-LAMP

实时荧光环介导等温扩增技术（Real-Time Fluorescence LAMP）是指在反应管中加入一定的荧光染料（例如 SYBR Green I），随着扩增产物地增加，荧光信号不断增强，

然后利用实时荧光检测仪器基于荧光值来分析扩增的情况。2015 年于颖等[23]利用 RTF-LAMP 法检测牛乳中金黄色葡萄球菌，结果显示 RTF-LAMP 法最低检测限达 8.0 CFU/mL，比普通 LAMP 法灵敏度高 10 倍。而利用 RTF-LAMP 法检测人工污染牛乳样品时，检出下限可达 23 CFU/mL，可有效地进行乳制品安全监测。最近赵彩红等[24]研究出检测食用植物油中是否加入地沟油的 RTE-LAMP 检测法，利用动物线粒体靶基因设计 LAMP 引物，一次反应能够同时扩增出牛、羊、猪和鸡等脊椎动物 DNA 序列，用以检测植物油中是否有地沟油；同时利用 LAMP 扩增产物加入 SYBR Green I 荧光染料，通过实时荧光 PCR 仪收集荧光信号加以分析，可检出植物油中最低含量为 0.01 ng /μL 的动物源性 DNA。

3.3 纳米金-LAMP

纳米金是大小为 1~100 nm 的金粒子，可与 DNA 连接形成探针监控 LAMP 技术检测产物的扩增。Seetang-Nun 等[25]和 Suebsing 等[26]都利用了纳米金实现了靶基因特异性的可视化 LAMP 产物检测。他们在 LAMP 扩增产物中加入纳米金探针，反应无特异扩增产物存在时，纳米金探针保持游离状态。此时加入高浓度的镁离子将发生盐离子诱导的聚集，使体系由红色变成紫色或灰色；反之纳米金探针将被整合入携带大量负电荷的扩增产物中，由于无盐诱导的聚集而保持体系的红色。运用此方法，Alejandro Garrido-Maestu 等[27]建立了 LAMP-AuNPs 微流控芯片系统来检测食品中的沙门氏菌。用 DNA 模板和 LAMP 试剂配制反应体系，反应后与官能化的纳米金粒子混合，用肉眼观察结果，阳性呈红色而阴性呈紫色。所得结果特异度高，准确度可达 100%。证明纳米金-LAMP 能够进一步提高 LAMP 检测的准确率，并且可视化观察结果使操作更为简单。

3.4 LAMP-ELISA

酶联免疫吸附试验（ELISA）是将抗原抗体免疫反应特异性和酶高效催化作用结合的应用技术。而 LAMP-ELISA 是将 LAMP 和酶联免疫吸附试验（ELISA）相结合应用的新型技术，通过酶联免疫产物带来的 OD 值变化反映目的基因的数量，使检测终点的判断更精确。M.R. Romero 等[28]利用免疫磁珠分离环介导等温扩增对 17 个商品火鸡养殖场样品进行检测，结果表明空肠弯曲杆菌高于 22 基因组拷贝检测下限的成功概率可达 95%以上，与标准微生物学长时间的分离鉴定规程相比较，这种灵敏度水平足以满足

家禽养殖场检测的要求以阻止食源性病原菌混入食物链。Ravan 等[29-30]在检测 D 血清型沙门氏菌的研究中，将带有地高辛标记的 LAMP 产物变性，稀释后加入到带有靶基因特异性探针的链霉亲和素包被的微量滴定板中，发生 ELISA 反应。检测限低至 10^3 CFU/mL；随后又尝试进一步改进，在 LAMP 引物中使用了 5'端用生物素标记的环引物，这样探针与靶基因的结合就能和扩增反应同时进行，检测限最终可达到 10 CFU/mL，比常规 PCR 和通过浊度进行结果判断的 LAMP 灵敏 100 倍。LAMP-ELISA 对产物的检测更精准，仪器设备要求较低, 并且对试验操作人员无健康损害，属环境友好型检测手段。

4. LAMP 与其他技术平台的联合应用

大量的基础研究工作体现了 LAMP 技术在食品安全监测方面的应用价值，近年来，许多新型技术平台与 LAMP 技术的结合开发出了具有更高临床应用价值的现场食品安全检测平台。

4.1 与电化学检测技术联合

DNA 分子具有电活性，且电化学检测器具有简便、灵敏和成本低的特点，因而可将 LAMP 与电化学检测技术结合起来。2017 年 Koji Hashimoto 等人[31]开发出一种新型的靶核酸序列检测系统，结合 LAMP 实时检测的电化学 DNA 芯片。在 65℃下连续线性扫描电化学 DNA 芯片反应液，可定量检测到每 50 μl 样本 10^3-10^6 的核酸，检测下限约为 10 拷贝。同年，Kawai K 等[32]也设计了一种简单高灵敏度的电化学 DNA 芯片，能特异检测牛奶样品中乳腺炎病原体，利用电化学活性剂 Hoechst 33258 染料和金电极上固定的 DNA 探针进行芯片检测。所得结果和细菌分离培养法的比较，DNA 的总阳性符合率 85%，总阴性符合率为 86.9%，而两种方法结果不符合的数据经分析推测为分离培养灵敏度较低引起，因此该方法适用于快速和高灵敏检测乳腺炎病原体。

4.2 与芯片工作站联合

芯片工作站（Lab-on-a-chip）是指把生物和化学等领域中所涉及的样品制备、生物化学反应、分离检测等基本操作单位集成于一块芯片上，用以完成不同的生物或化学反应过程，并对其产物进行分析的一种技术[33]。将 LAMP 与芯片进行结合，一块芯片上可同时发生多个 LAMP 反应，且芯片具有便携性的特点, 能够同时方便快捷的检测样品中的多种微生物。现阶段，将 LAMP 与芯片实验室结合已有多项研究报道。2017 年

Dohwan Lee 等[34]成功地开发出一种高灵敏度、快速的 LAMP-ICSl 微型器件，用于检测人体血液和牛奶中的金黄色葡萄球菌和大肠杆菌。结果表明，直接的 LAMP 反应不受人血和牛奶中的一些成分对聚合酶的抑制，且不需要 DNA 提取和纯化步骤，非常适用于食品安全的检测（图 2）。

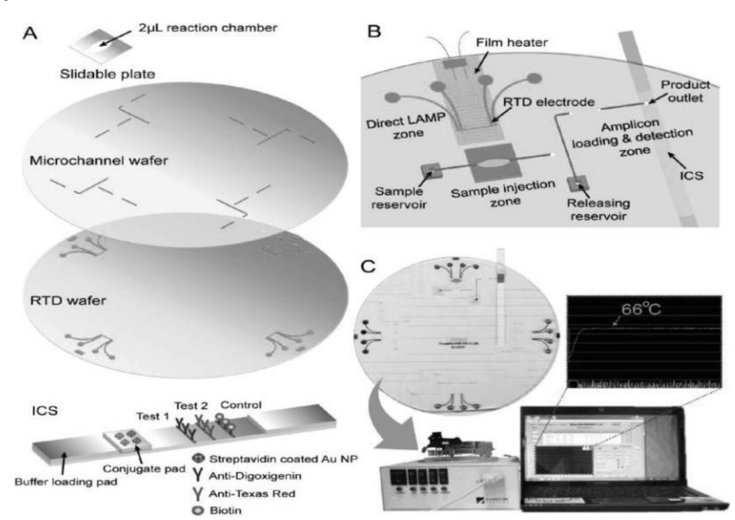


图 2　环介导等温扩增结合胶体金免疫层析试纸条的微型器件[34]

Fig. 2　Microdevices of ring mediated isothermal amplification and colloidal gold immunochromatography paper（Dohwan Lee et al.,2016）

4.3　与数字核酸扩增技术联合

数字微流体（DMF）是分子诊断领域最新研究平台之一，将 DMF 与 LAMP 结合起来将成为新一代有效分子诊断体系的重要革新。Gansen 等[35]研发出一种样品自主数字化芯片，其不需要液压阀或机械作用，而利用流体现象形成液滴。样品在流体力和表面张力的共同作用下自发进入的液滴，简化了芯片的构造。芯片上有足够多的小室，可以使样品完全数字化。样品自主数字化芯片和 LAMP 结合制造出的数字 LAMP 仪，可以在 70min 内准确地进行 DNA 定量。在 Beatriz Jorge Coelho 等人[36]的研究中整合了一个 DMF 和 LAMP 的平台，用于扩增 *c-myc* 癌基因，其首次演示了联合 DMF 和 LAMP 的作用，设计一个可以直接混合灯试剂和目标 DNA 专门的设备中，以及最佳的温度控制。在总反应体积为 1.5μL 时，45 min 成功地实现了 *c-myc* 基因片段的 LAMP 扩增。期望在不久的将来，结合 DM 和 LAMP 平台的方法也可应用于食品安全的监测（图 3）。

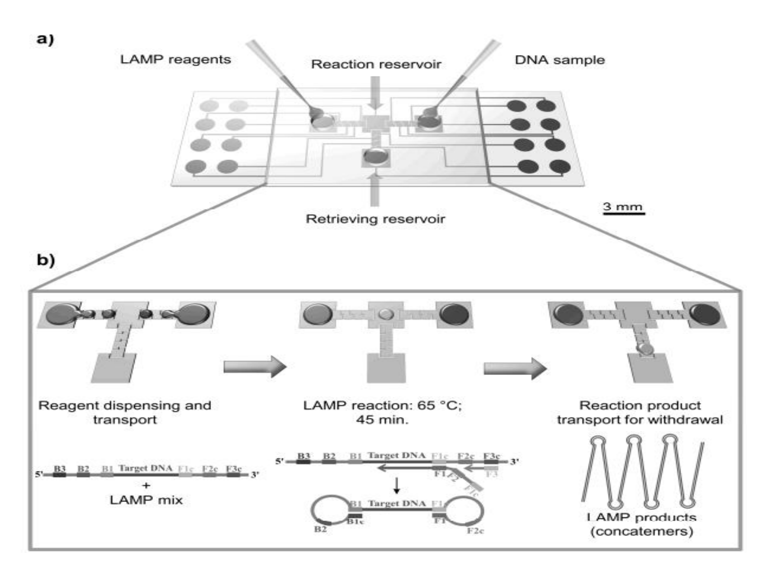


图 3　数字微交流的环介导等温扩增[36]

Fig. 3　Digital microfluidics with loop-mediated isothermal amplification（Beatriz Jorge Coelho et al.,2017）

5.　结语

LAMP 是一项具有突破性的，快速而简单的核酸诊断的工具。与传统的检测方法相比，LAMP 工作引物针对靶基因的 6 个特异区域设计，具有超高的特异性，并且灵敏度比常规 PCR 高 10 到 100 倍。其突出优势在于检测所需的时间更短、也不需要昂贵的 PCR 仪等循环温控设备，检测结果的可视化，肉眼可判读。

然而，LAMP 技术也有一些不容忽视缺点。由于 LAMP 技术反应体系的成分较为复杂的,且反应的时间、温度等都会影响最终的试验结果，因此实验必须进行反应体系优化，寻求最佳的反应条件。其超高灵敏度在提高检测准确度的同时使得反应过程易受污染，产生汽溶胶现象而造成假阳性结果不易鉴别，对操作环境和人员的操作有一定要求。因此 LAMP 技术的的改进和优化还需进一步发展，在未来开发中需要相关研究，如产物修饰、产物降解和不开盖判读结果等方式来控制假阳性率，以进一步提高检测准确性。

当然除了操作简单和适应于现场检测，LAMP 还具备实时检测所需的所有潜质，特别是其高灵敏度和简便性。在食品安全检测中应用 LAMP 可以缩短检测时间，简化检测过程，因此非常具有研究和应用价值。以 LAMP 为基础的衍生技术也不断发展起来，使 LAMP 技术不断的优化和完善，例如多重 LAMP 技术、LAMP 与芯片、数字核酸技术的

联合，实现快速、特异、灵敏、高通量的检测，十分具有应用前景。在不远的将来，期望 LAMP 结合其他新技术开发的检测体系和设备，在食品安全检测方面会有更好的推广和应用。

参考文献：

[1] NotomiT,OkayamaH,MasubuchiH,et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. Nucleic Acids Res,2000,28(12):e36.

[2] Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primer. Mol Cell Probes, 2002, 16(3): 223-229.

[3] 边忠博,孙如一,王磊,等.LAMP 技术在动物源性食品安全检测中的应用.中国调味品,2017,11(42): 127-129. Bian Z B, Sun R Y, Wang L, et al. Application of LAMP technology in animal origin food safety inspection. China Condiment, 2017,11(42): 127-129.

[4] Tomita N, Mori Y, Kanda H, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. Nat Protoc, 2008,3(5):877-882.

[5] 高瑶,孟星宇,罗玉子,等.等温扩增技术的原理及其在病原检测中的应用.动物医学进展,2017,39(4):21-25. Gao Y, Meng X Y, Luo Y Z, et al. The principle of isothermal amplification and its application in pathogen detection. Progress in veterinary medicine. 2017,39(4):21-25.

[6] Liu A,GuanG,DuP,etal.Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method based on two species-specific primer sets for the rapid identification of Chinese Babesiabovis and B. bigemina. Parasitol,2012,61(4):658-663.

[7] Li Q,Yue Z, Liu H,etal.Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of lymphocystis disease virus. Virol Methods,2010,163(2):378-384.

[8] YanmeiLi,PenghuiFan,ShishuiZhou,etal.Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A novel rapid detection platform for pathogens. Microbial Pathog,2017,107:54-61.

[9] Notomi T, Mori T, Tomita N,et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. Journal of Microbiology,2015,53(1):1-5.

[10] Nzelu CO,CáceresAG,Guerrero-QuinchoS, et al.A rapid molecular diag-nosis of cutaneous leishmaniasis by colorimetric malachite green-loop-mediated isothermal amplification (LAMP) combined with an FTA card as a direct sampling tool, Acta Trop,2016,153:116-119.

[11]姚贵哲,王伟利,夏明,等.沙门氏菌现场快速检测方法的建立.黑龙江畜牧兽医,2018,3:172-174. Yao G Z, Wang W L, Xia M, et al. Establishment of a rapid detection method for Salmonella.Heilongjiang animal science and veterinary medicine,2018,3:172-174.

[12] Pham NT,Trinh QD,Khamrin P,et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) for Detection of Campylobacter jejuni and C. coli in Thai Children with Diarrhea.Jpn J Infect Dis,2015,68:432-433.

[13] Somaye Bakhtiari, Amirhooshang Alvandi, Hamid Pajavand,etal. Development and Diagnostic Evaluation of Loop-Mediated Isothermal Amplification Using a New Gene Target for Rapid Detection of Helicobacter pylori.Jundishapur J Microbiol, 2016, 9:e28831.

[14] Lim HS, Zheng Q, Miks-Krajnik M, et al. Evaluation of Commercial Kit Based on Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of Low Levels of Uninjured and Injured Salmonella on Duck Meat, Bean Sprouts, and Fishballs in Singapore.Journal of Food Protection, 2015, 78: 1203-1207.

[15] Techathuvanan C, D'Souza DH.Reverse-transcriptase loop-mediated isothermal amplification as a rapid screening/monitoring tool for Salmonella Enterica detection in liquid whole eggs.Journal of FoodScience, 2012, 77 (4) :200-205.

[16] 李晓霞，贾淼，金君华，等. 原料乳中金黄色葡萄球菌环介导等温扩增 (LAMP) 检测方法的建立及应用. 江苏农业学报, 2017, 33(05): 1171-1175.

Li X X, Jia M, Jin J H, et al. The establishment and application of LAMP detection method for staphylococcus aureus in raw milk. Journal of jiangsu agriculture, 2017, 33(05): 1171-1175.

[17] Arai S, Tohya M, YamadaR,etal.Development of loop-mediated isothermal amplification to detect Streptococcus suis and its application to retail pork meat in Japan.International Journal of Food Microbiology,2015, 208: 35-42.

[18] Deb R,SengarGS,SinghU,etal.LAMP assay for rapid diagnosis of cow DNA in goat milk and meat samples.Iranian Journal of Veterinary Research, 2017 , 18(2) : 134-137.

[19] 杨柳,陈宇飞,王磊.调味粉中罂粟碱 LAMP 检测方法建立及试剂盒研制.中国调味品,2017,42(12):158-161.

Yang L, Chen Y F, Wang L. Establishment of a LAMP method for the determination of papaverine in condiment and development of its kit. Chinese condiments, 2017,42(12):158-161.

[20] Wang C,Li R,Quan S,etal.GMO detection in food and feed through screening by visual loop-mediated isothermal amplification assays. Analytical & Bioanalytical Chemistry,2015 , 407 (16) :4829-4834.

[21] 蔡树东,吴双,赵维芯,等.环介导等温扩增技术的改良及其在检测中的应用进展.河南农业科学,2016,45(8):7-11.

Cai L D, Wu S, Zhang W X, et al. Improvement of loop mediated isothermal amplification and its application in detection. Henan Agricultural Sciences,2016,45(8):7-11.

[22] 何玲,罗满林,陈瑞爱.环介导等温扩增技术在动物病原检测中的应用.广东畜牧兽医科技,2009,34(5):14-16.

He L, Luo M L, Chen R A.Application of loop mediated isothermal amplification in detection of animal pathogens. Animal husbandry and veterinary science and technology in Guangdong, 2009,34(5):14-16.

[23] Stratakos AC, Linton M, Millington S,et al. A loop-mediated isothermal amplification method for rapid direct detection and differentiation of nonpathogenic and verocytotoxigenic Escherichia coli in beef and bovine faeces.Journal of Applied Microbiology,2017,122(3):817-828.

[24] 于颖.实时荧光 LAMP 技术检测牛乳中金黄色葡萄球菌的研究.河北：河北农业大学,2015.

Yu Y. Detection of Staphylococcus aureus in milk by real-time fluorescence LAMP.Hebei: Agricultural University of Hebei, 2015.

[25] 赵彩红,蔡勇,曹忻,等.环介导恒温扩增快速检测植物油中掺假地沟油方法的建立.食品工业科技,2018,39(2)：240-244.

Zhang C H, Cai Y, Cao X, et al. Establishment of loop mediated isothermal amplification for rapid detection of adulterated cooking oil in vegetable oils. Food industry technology, 2018, 39(2)：240-244.

[26] Seetang-Nun Y, Jaroenram W, Sriurairatana S, et al. Visual detection of white spot syndrome virus using DNA-functionalized gold nanoparticlesas probes combined with loop-mediated isothermal amplification. Mol Cell Probes, 2013, 27(2): 71–79.

[27] Suebsing R, Prombun P, Kiatpathomchai W. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) combined with colorimetric gold nanoparticle(AuNP)probe assay for visual detection of Penaeusvannameinodavirus (PvNV). Lett ApplMicrobiol, 2013, 56(6): 428–435.
[28] Alejandro Garrido-Maestu, Sarah Azinheiro, Joana Carvalho,et al.Combination of Microfluidic Loop-Mediated Isothermal Amplification with Gold Nanoparticles for Rapid Detection of Salmonella spp. in Food Samples.Frontiers in Microbiology, 2017 , 8: 2159.
[29] Romero MR, D'Agostino M, Arias AP, et al.Animmunomagnetic separation/loop-mediated isothermal amplification method for rapid direct detection of thermotolerant Campylobacter spp. during poultry production.Journal of Applied Microbiology,2016,120(2) :469-477.
[30] RavanH,YazdanparastR.Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification method in conjunction with anenzyme-linked immunosorbent assay for specific detection of Salmonella serogroup D.Anal ChimActa,2012,6(733):64-70.
[31] RavanH,YazdanparastR.Loop region-specific oligonucleotide probes for loop-mediated isothermal amplification-enzyme-linked immunosorbent assay truly minimize the instrument needed for detection process.Anal Biochem,2013,439(2):102-108.
[32] Hashimoto K, Inada M, Ito K.A novel voltammetric approach for real-time electrochemical detection of targeted nucleic acid sequences using LAMP.Anal Biochem,2017,539:113-117.
[33] Kawai K, Inada M,ItoK,etal.Detection of bovine mastitis pathogens by loop-mediated isothermal amplification and an electrochemical DNA chip. Journal of Veterinary Medical Science, 2017,79(12): 1973-1977.
[34] Zhi X, Deng M, Yang H,etal.A novel HBV genotypes detecting system combined with microfluidic chip, loop-mediated isothermal amplification and GMR sensors.Biosens Bioelectron,2014,54(54):372-377.
[35] Lee D, Kim YT, Lee JW ,etal.An integrated direct loop-mediated isothermal amplification microdevice incorporated with an immunochromatographic strip for bacteria detection in human whole blood and milk without a sample preparation step.Biosens Bioelectron,2016, 79:273-279.
[36] GansenA,Herrick AM,Dimov IK,etal.Digital LAMP in a sample self-digitization(SD) chip. Lab Chip,2012,12(12) :2247-2254.
[37] Coelho BJ, Veigas B, Águas H, etal.A Digital Microfluidics Platform for Loop-Mediated Isothermal Amplification Detection. Sensors, 2017,17(11):2616

Research Progress Of Loop-MediatedIsothermal Amplification In Food SafetyTesting

WANG Jing XU Xin WANGXue-yu YAO Lun-guang

KAN Yun-chao JI Jun

(Center for Nanyang Veterinary Biological Engineering Technologh/Henan Provincial Engineering

Laboratory of Insect Bio-reactor, Nanyang Normal University, Nanyang 473061, China)

Abstract: Food safety has been the focus of public health throughout the world. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) technique is a kind of simple and rapid isothermal nucleic acid amplification technology with high specificity, and outstanding sensitivity. Recently, LAMP has been widely evaluated and applied in the field of nucleic-acid detection. LAMP technology can be applied to the food safety detection field, quickly and accurately monitored in a number of food safety problems harm to human health. Therefore, the advantages of LAMP technology in food safety detection are analyzed and combined with the combination of LAMP technology and new diagnostic technology platform.

Keywords: Loop-Mediated Isothermal Amplification food safety nucleic acid test optimization Joint application